

明 細 書

糖鎖改変抗HM1.24抗体

技術分野

本発明は、抗体依存性細胞傷害性 (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity; ADCC) が増強された、HM1.24抗原に対する抗体 (抗HM1.24抗体) 及びその製造方法に関する。

背景技術

HM1.24抗原は、骨髓腫細胞表面に高発現する分子量29~33kDaの膜蛋白質であり (Ishikawa J. et al., Genomics 26(1995), 527-534)、骨髓腫細胞以外にもB腫瘍細胞及びT腫瘍細胞においても発現が認められている。正常細胞においては、イムノグロブリン産生B細胞や活性化T細胞で確認されており、その他の細胞においてはほとんど発現が認められていない (Goto T. et al., Blood 84(1994), 1922-1930)。

HM1.24抗原の上記の如き組織分布のため、HM1.24抗原に対する抗体 (抗HM1.24抗体) は、腫瘍に特異的に集積するため、この抗体をラジオアイソトープで標識することによる腫瘍局在の診断や、ラジオイムノセラピー (radioimmunotherapy) などのミサイル療法への利用が期待されるほか、抗HM1.24抗体は、それ自体、抗体依存性細胞傷害性 (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity; ADCC) を有する (Ozaki S. et al., Blood 90(1997), 3179-3186) ので、多発性骨髓腫などの骨髓腫治療薬などとしての利用が期待される。

このような、抗HM1.24抗体の療法的使用に当っては、ヒトに対する免疫原性が低いことが望ましく、このため抗HM1.24抗体の再構成

ヒト（ヒト化）抗体が開発されている（WO 98/14580）。しかしながら、ADCC活性が一層増強されたHM1.24抗体、特にADCC活性が増強されたヒト化HM1.24抗体の提供が望まれている。

抗体のADCC活性を増強する方法としては、抗体の糖鎖を改変する方法が知られている。例えば、WO 99/54342には、抗体のグリコシル化を修飾することによりADCC活性を改良することが記載されている。また、WO 00/61739には、抗体の糖鎖におけるフコースの存否によりADCC活性を調節することが記載されている。WO 02/31140には、YB2/0細胞において抗体を産生せしめることにより、 α -1,6core fucoseを含まない糖鎖を有する抗体を調製することが記載されている。WO 02/79255には、バイセクティングGlcNAcを有する糖鎖を有する抗体が記載されている。しかしながら、糖鎖の修飾によってADCC活性が増強されたHM1.24抗体は知られていない。

特許文献 1 WO 98/14580

特許文献 2 WO 99/54342

特許文献 3 WO 00/61739

特許文献 4 WO 02/31140

特許文献 5 WO 02/79255

非特許文献 1 Ishikawa J. et al., Genomics 26(1995), 527-534

非特許文献 2 Goto T. et al., Blood 84(1994), 1922-1930

非特許文献 3 Ozaki S. et al., Blood 90(1997), 3179-3186

発明の開示

従って、本発明は糖鎖の修飾によってADCC活性が増強された抗HM1.24抗体及びその製造方法を提供しようとするものである。

本発明者は上記の課題を解決すべく種々検討した結果、 α -1,6コ

アフコース (α -1,6core fucose) (還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位とが α 結合している。)を含まない糖鎖を有する抗HM1.24抗体、及びバイセクティング (bisecting) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 構造を有する糖鎖を有する抗体が高いADCC活性を有するほか、 α -1,6コアアフコース (α -1,6core fucose) を含まない糖鎖とバイセクティング (bisecting) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 構造を有する糖鎖を共に有する抗HM1.24抗体が、一層高いADCC活性を有することを見出し本発明を完成した。

従って本発明は、糖鎖が改変された、HM1.24抗原に対する抗体 (抗HM1.24抗体)、例えば糖鎖の改変により抗体依存性細胞傷害性 (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity; ADCC) が増強された、HM1.24抗原に対する抗体 (抗HM1.24抗体) を提供する。この抗体は、典型的にはモノクローナル抗体またはそれに由来する抗体であり、例えばキメラ抗体、又は更に好ましくはヒト化抗体である。より具体的には、本発明は、 α -1,6コアアフコース (α -1,6core fucose) を含まない糖鎖を有する抗体、及びバイセクティング (bisecting) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 構造を有する糖鎖を有する抗体、更には、 α -1,6コアアフコース (α -1,6core fucose) を含まない糖鎖を有し、且つバイセクティング (bisecting) N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 構造を有する糖鎖を有する抗体を提供する。

本発明はまた、フコースを含まない糖鎖を有する抗HM1.24抗体を含む抗体組成物であって、フコースを含まない糖鎖の相対比率が30%以上である抗体組成物を提供する。かかる相対比率は、より好ましくは35%以上である。

本発明はまた、上記の糖鎖が修飾された抗体製造方法において、

HM1.24抗原に対する抗体（抗HM1.24抗体）をコードする核酸が導入されたYB2/0細胞を培養し、そして当該培養物から当該抗体を採取することを特徴とする方法；N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII（GnTIII）をコードする核酸を導入した宿主細胞を培養し、当該培養物から当該抗体を採取することを特徴とする方法；並びに、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII（GnTIII）をコードする核酸を導入したYB2/0細胞を培養し、そして当該培養物から当該抗体を採取することを特徴とする方法を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、YB2/0で発現させた精製ヒト化抗ヒトHM1.24抗体のSDS-PAGE（12%T）のパターンを示す。左図：還元条件下、右図：非還元条件下。精製ヒト化抗ヒトHM1.24抗体各4 μ gをアプライした。

図2は、HM1.24抗体-DG44とHM1.24抗体-YBの各抗体濃度におけるヒトPBMCのADCC活性を、4種類のHM1.24抗原発現CHO細胞（HM26，HM31，HM21，HM36）を標的細胞として、E/T ratio=25で測定した結果である。

図3は、HM1.24抗体-DG44とHM1.24抗体-YB 1mg/mLにおけるヒトPBMCのADCC活性を、HM31を標的細胞として、E/T ratio=1，5，25で測定した結果である。

図4は、CHO由来の抗体(a)及びYB2/0由来抗体(b)から調製したPA化糖鎖の逆相HPLCクロマトグラムである。産生細胞の種類により糖鎖パターンが変化し、特にYB2/0由来抗体では、フコース無しと推定されるピーク群(A-D)が増加していることを示している。

図5は、第4図と第1表で示した糖A～Hの構造を示す。

図6は、第4図と第1表で示した糖I～Oの構造を示す。

図 7 は、ヒト GnTIII cDNA の PCR による全合成に使用したプライマー配列と組合わせを示した。予めプライマーに導入した BamHI 配列の前後の PCR 断片を同部位で連結し、ヒト GnTIII cDNA 全配列を取得した。

図 8 は、HM1.24 抗体-DG44 及び GnTIII 発現ヒト化抗ヒト HM1.24 抗体産生株由来抗体 100ng/mL における ADCC 活性の比較。GnTIII を発現させることにより ADCC 活性が増強している抗体産生株が得られた。

図 9 は、HM1.24 抗体-DG44 と GnTIII 発現 CHO 細胞由来ヒト化抗ヒト HM1.24 抗体の各抗体濃度におけるヒト PBMC の ADCC 活性を、HM36 を標的細胞として、E/T ratio=25 で測定した結果である。

図 10 は、生来型ヒト GnTIII をコードする塩基配列（配列番号：28）（GnTIII ori.nuc）と変異型ヒト GnTIII をコードする塩基配列（配列番号：29）（GnTIII mut.nuc）と対比を示す。図中、星印は、両配列の対応する塩基が同一であることを示す。

図 11 は、生来型ヒト GnTIII をコードする塩基配列（配列番号：28）（GnTIII ori.nuc）と変異型ヒト GnTIII をコードする塩基配列（配列番号：29）（GnTIII mut.nuc）と対比を示す。図中、星印は、両配列の対応する塩基が同一であることを示す。

図 12 は、生来型ヒト GnTIII をコードする塩基配列（配列番号：28）（GnTIII ori.nuc）と変異型ヒト GnTIII をコードする塩基配列（配列番号：29）（GnTIII mut.nuc）と対比を示す。図中、星印は、両配列の対応する塩基が同一であることを示す。

図 13 は、生来型ヒト GnTIII をコードする塩基配列（配列番号：28）（GnTIII ori.nuc）と変異型ヒト GnTIII をコードする塩基配列（配列番号：29）（GnTIII mut.nuc）と対比を示す。図中、星印は、両配列の対応する塩基が同一であることを示す。

図 14 は、生来型ヒト GnTIII をコードする塩基配列（配列番号

: 28) (GnTIII ori.nuc) と変異型ヒトGnTIII をコードする塩基配列 (配列番号: 29) (GnTIII mut.nuc) と対比を示す。図中、星印は、両配列の対応する塩基が同一であることを示す。

図 15 は、生来型ヒトGnTIII をコードする塩基配列 (配列番号: 28) (GnTIII ori.nuc) と変異型ヒトGnTIII をコードする塩基配列 (配列番号: 29) (GnTIII mut.nuc) と対比を示す。図中、星印は、両配列の対応する塩基が同一であることを示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明において、糖鎖が改変された抗体 (糖鎖改変抗体) とは、基準となる宿主細胞により産生される抗体 (好ましくは、かかる宿主細胞により産生される抗体のうち、最も高い割合で産生される抗体) の糖鎖構造と比較した場合に、これとは異なる糖鎖構造を有する抗体をいい、これには、基準となる宿主細胞によっては通常 (又は主としては) 産生されない糖鎖構造を有する抗体なども含まれる。また、本発明の糖鎖改変抗体を、必ずしも均一ではない種々の構造の糖鎖を有する抗体分子の集合体 (本願においては、抗体組成物とも称する) として考える場合には、基準となる宿主細胞により産生される抗体組成物と比較して、これとは糖鎖改変抗体の割合が異なる抗体組成物であることを意味し、このような本発明の抗体組成物には、基準となる宿主細胞によっては通常 (又は主としては) 産生されない糖鎖構造を有する抗体を含む抗体組成物なども含まれる。

基準となる宿主細胞は特に限定されず、例えば、CHO dhfr⁻細胞 (ATCC CRL-9096)、CHO K1 (ATCC CCL-61)、CHO DG44等を挙げることができるが、CHO DG44細胞を基準となる宿主細胞として用いることが好ましい。

糖鎖改変抗体の例としては、フコース（好ましくは、 α -1,6コアーフコース（ α -1,6core fucose）が欠損した糖鎖を有するフコース欠損抗体、糖鎖にバイセクティング（bisecting）N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）が付加した抗体などを挙げることもできる。

本発明の糖鎖改変抗体を抗体組成物として捉える場合には、全て同一の構造の糖鎖を有する均一な抗体を含有する組成物である必要はなく、従って、本発明においては、抗体組成物に含まれる糖鎖改変抗体の割合が、上述のような基準となる宿主細胞により産生される抗体組成物に含まれる糖鎖改変抗体と比較して異なっていればよい。本発明は、このような糖鎖改変抗体組成物を含む。本発明の糖鎖改変抗体組成物であるか否かは、対象となる抗体組成物に含まれる糖鎖改変抗体の割合が、上述のような基準となる抗体組成物に含まれる糖鎖改変抗体の割合と異なるか否かで判断することができる。かかる割合の比較は、例えば、後述の実施例8に記載のような分析方法により認識される各糖鎖の相対比率を比較することにより行うことができる。

本発明の糖鎖の修飾によりADCC活性が増強された抗HM1.24抗体を得るには、 α -1,6コアーフコース（ α -1,6core fucose）を付加する能力を有しないか又はその能力が低い宿主細胞中で抗HM1.24抗体を発現させるか、あるいは糖鎖にバイセクティング（bisecting）N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）構造を形成する能力を有する宿主細胞中で抗HM1.24抗体を発現させる必要がある。そして、そのためには、目的とする抗HM1.24抗体をコードする遺伝子がクローニングされなければならない。そして、クローニングされた遺伝子によりコードされた抗HM1.24抗体としては、モノクローナル抗体、可変領域がマウスなどのヒト以外の動物に由来し、不変領域がヒトの

抗体に由来するキメラ抗体、可変領域中の相補性決定領域のみがマウスなどのヒト以外の動物の抗体に由来し、それ以外の抗体部分はヒト抗体に由来するヒト化抗体などが上げられる。

W0 98/14580の記載から明らかな通り、モノクローナル抗HM1.24抗体を産生するハイブリドーマは既に樹立されており、このハイブリドーマは、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に、平成7年4月27日に、FERM BP-5233として寄託されている。また、このハイブリドーマから、軽鎖可変領域（L鎖V領域）をコードするDNA及び重鎖可変領域（H鎖V領域）をコードするDNAがクローニングされ、そしてこれらのDNAを含むプラスミドを収容した大腸菌が、それぞれ、*Escherichia coli* DH5 α (pUC19-1.24L-g κ) (FERM BP-5646) 及び *Escherichia coli* DH5 α (pUC19-1.24H-g γ 1) (FERM BP-5644) として、平成8年8月29日に、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に寄託されている。さらに、上にクローニングしたL鎖V領域をコードするDNA及びH鎖V領域をコードするDNAから、キメラ抗HM1.24抗体及びヒト化抗HM1.24抗体が作成された。ヒト化抗体については、W0 98/14580の第37頁～第40頁の表1～表4に示されるように、ヒト化抗体のL鎖についてはバージョン a 及び b が作製され、H鎖については、バージョン a ～ s が作製され、これらを組み合わせたヒト化抗体の抗原結合活性の測定の結果、L鎖バージョン a とH鎖バージョン r 又は s との組み合わせから成るヒト化抗体が強力な抗原結合活性を有することが確認された。

従って、本発明においては、上に引用したW0 98/14580に記載されている種々のモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体などを使用することができる。しかしながら、上記の抗体のみならず、

HM1.24に対する他のモノクローナル抗体に由来するキメラ抗体、ヒト化抗体などを使用することもできる。その場合、これらの調製方法としては、例えばW0 98/14580に記載されている方法を用いることができる。

抗HM1.24抗体に結合する糖鎖には、抗体分子のアスパラギンの側鎖のN原子に結合するN-グリコシド結合糖鎖と、抗体分子のセリン又はスレオニンの側鎖ヒドロキシル基に結合するO-グリコシル結合糖鎖とがあり、本発明においてフコースの存否が問題となるのはN-グリコシル結合糖鎖である。このN-グリコシル結合糖鎖は、図5及び図6に示すごとく、1個のマンノース(Man)と2個のN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が β 1,4結合で結合した基本構造(コア)「-Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-」を有し、この構造の右のGlcNAcを還元末端と称し、左側のManを非還元末端と称する。フコース(Fuc)が結合している場合、これは主として、還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位とフコースの1位とが α 結合している。

本発明の一つの態様によれば、抗HM1.24抗体は上記のフコースを含まない糖鎖を有する。抗体分子が複数のN-グリコシル糖鎖を有する場合、少なくとも1個の糖鎖は上記のフコースを有しない。このような、フコースを含まない糖鎖を有する抗体は、当該抗体を、糖鎖へのフコース付加能を欠失した細胞、すなわち、フコース転移活性を有しないか又はこの活性が低い宿主中で発現させれば良い。

本発明においては、フコース転移活性を有しないか又はこの活性が低い任意の宿主を用いることができるが、具体例として、ラットミエローマYB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞(YB2/0細胞と略される)(ATCC CRL 1662として保存されている)が挙げられる。本発明で用いることができるその他の細胞としては、例えば、FTVIIIノックアウト

トCHO細胞(WO 02/31140)、Lec13 細胞(W003/035835)、フコーストランスポーター欠損細胞(特願2003-174006、特願2003-282081、特願2003-174010、特願2003-282102)を挙げることができる。

本発明のもう一つの態様によれば、本発明の抗HM1.24抗体は、バイセクティング(bisecting) N-アセチルグルコサミンを有する糖鎖を有する。N-グリコシル結合糖鎖は前記の如き基本構造(コアー)を有し、その非還元末端には、図5に示すごとく、マンノースを含む2個の鎖が α 1,6結合及び α 1,3結合により結合している。他方、図6に示す糖鎖においては、基本構造(コアー)の非還元末端に、前記2個の糖鎖のほかに、1個のN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が β 1,4結合により結合している。このN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)が、「バイセクテングN-アセチルグルコサミン」である。

バイセクティングN-アセチルグルコサミンを有する糖鎖は、O-グリコシル結合糖鎖又はN-グリコシル結合糖鎖であり、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTIII)により、N-アセチルグルコサミンを糖鎖に転移させることにより形成される。この酵素をコードする遺伝子は既にクローニングされており、そのアミノ酸配列及びそれをコードするDNAの塩基配列は記載されている(NCBIデータベース(ACCESSION D13789))。また、このDNAは、上記の配列情報に基づいてPCR法など、常法に従って、クローニングすることができる。

GnTIII をコードするDNAを用いて、バイセクティングN-アセチルグルコサミンを有する糖鎖を形成するには、このDNAを含んでなる発現ベクターにより、抗HM1.24抗体を産生する宿主細胞を形質転換すればよい。すなわち、GnTIII をコードするDNAを含んで成る発現ベクターと抗HM1.24抗体をコードするDNAを含んで成る発現ベク

ターとにより、宿主細胞を形質転換し、これを培養すればよい。

本発明の第三の態様によれば、本発明の抗HM1.24抗体は、 α -1,6コアーフコース (α -1,6core fucose) を有しない糖鎖とバイセクティングN-アセチルグルコサミンを有する糖鎖の両方を有する。このタイプの抗体を製造するには、GnTIII をコードするDNAを含んで成る発現ベクターと抗HM1.24抗体をコードするDNAを含んで成る発現ベクターとにより、 α -1,6コアーフコースを有する糖鎖を形成する活性を有しないか又はこの活性が弱い宿主細胞、例えばYB2/O細胞、を形質転換し、これを培養すればよい。

宿主細胞の形質転換方法、培養方法、及び培養物からの抗体の単離・精製方法は、常法に従って行うことができる。

また、本発明の糖鎖改変抗体はADCC活性が増強されていることが好ましい。本発明において、ADCC活性が増強されているか否かは、糖鎖が改変されていない抗体又は糖鎖が改変されていない抗体組成物のADCC活性と比較して、これよりも高いADCC活性を示す場合にはADCC活性が増強されていると判断される。

ADCC活性は当業者に公知の方法により測定することができる。例えば、エフェクター細胞、標的細胞及び抗HM1.24抗体を混合し、ADCCの程度を調べることにより測定することができる。より具体的には、例えば、エフェクター細胞としてマウス脾細胞やヒト末梢血や骨髓から分離した単核球等を利用し、標的細胞としてはHM1.24抗原を発現するCHO細胞等を用いる。標的細胞をあらかじめ ^{51}Cr により標識し、これに抗HM1.24抗体を加えインキュベーションを行い、その後、標的細胞に対し適切な比のエフェクター細胞を加えインキュベーションを行う。インキュベーション後、上清を採取し、上清中の放射活性をカウントすることによりADCC活性を測定することができる。

実施例

次に、実施例により、本願発明を更に具体的に説明する。

実施例 1. ラットミエローマYB2/0でのヒト化抗ヒトHM1.24抗体の発現

10 μ gのヒト化抗ヒトHM1.24抗体発現ベクター (AHi/N5KG1V-lark, Barnett, R.S. et al. Antibody Production in Chinese Hamster Ovary Cells Using an Impaired Selectable Marker. In: Wang, H.Y. & Imanaka, T. (eds) ACS Symposium Series Vol 604:Antibody Expression and Engineering, 27, 1995, WO 98/4580) を $2 \times 10^6 / 0.6$ mL PBS(-)のYB2/0 (ATCC CRT-1662) へ、エレクトロポレーション法で1.5kV, 25 μ Fの条件で導入した。培養は5% CO₂インキュベーター内で37°Cで行った。

10% FCSを含むRPMI1640培地 (Gibco社) に400 μ g/mL Geneticinを加えて選択した後、50 nM MTX, 100 nM MTX, 200nM MTXと順次MTX濃度をあげ、遺伝子増幅を行った。また、96ウェルプレート (Falcon社) に200nM MTX、400 μ g/mL Geneticinを含む10% FCS/RPMI1640中、0.5 cells / 100 μ L / wellで蒔きこみ、限界希釈法にて細胞のクローニングを行った。

ヒト化抗ヒトHM1.24抗体遺伝子を導入したYB2/0細胞の培養上清は実施例2で示すELISAにより定量した。

実施例 2. ヒト化抗HM1.24抗体の定量(ELISA法)

96-ウェルELISA用プレート(Nunc社製)にコート緩衝液(100mmol/L炭酸水素ナトリウム, pH9.6)で100ng/ml程度に希釈した可溶型HM1.24抗原を100 μ Lずつ添加し、4°Cで1晩以上反応させた。反応後、1% BSA-PBSを200 μ L/ウェルで加え室温で約2時間放置し、作製したプレートは4°Cで保存した。1%BSA-PBSを転倒除去した後、各wellをTween-PBSで洗浄した。

適宜希釈したヒト化抗HM1.24抗体標準液又はサンプル溶液と100ng/mLに希釈したビオチン標識ヒト化抗HM1.24抗体を1:1で混ぜた後、100 μ L/wellで分注した。室温で、約1時間反応させた後、各ウェルをTween-PBSで洗浄した。アビジン標識HRPを各ウェルに添加し、室温で15分以上反応させ、TMB liquid(Sigma社製)を100 μ L/ウェルで加え、2 mol/L硫酸を50 μ L/ウェル加えることにより反応を止めた後、450nmの吸光度を測定した。ヒト化抗HM1.24抗体標準液の濃度－吸光度の検量線から、サンプル溶液のヒト化HM1.24抗体濃度を算出した。

実施例 3. YB2/0で発現させたヒト化抗ヒトHM1.24抗体の精製

ヒト化抗ヒトHM1.24抗体の発現が確認された細胞は、1700cm²のローラーボトル (CORNING社) で拡大培養を行った。すなわち1 \times 10⁹個のヒト化抗ヒトHM1.24抗体発現YB2/0細胞を400mLの200nM MTX、400 μ g/mL ゲンタマイシンを含む10% FCS/RPMI1640培地で(2.5rpm)でコンフルエントになるまで培養した。その後、培養上清の回収用にFCSをPBS(-)で平衡化したrProteinA FF(AmershamPharmacia社)を予め素通りさせることでウシ由来IgGを除き (FCS(-))、このFCS(-)を用いた200nM MTX、400 μ g/mLゲンタマイシンを含む10%FCS(-)/RPMI1640培地で3～4日間培養した。

培養上清は0.22 μ mフィルター処理した後、rProteinA FF(PBS/PBS-クエン酸:リニアグラジエント溶出)およびSource15S (20mM酢酸、0-0.5mM NaCl:リニアグラジエント溶出) で精製した。精製したヒト化抗ヒトHM1.24抗体はHM1.24抗体-YBと名付けた(図1)。

実施例 4. HM1.24抗原(BST-2)を発現するCHO細胞の作製

HM1.24抗原蛋白質を発現するCHO細胞を次のようにして作製した(Ohtomo T. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 258(1999), 583-591)。即ち、DHFRを欠損したCHO細胞株

に、HM1.24抗原をコードする発現ベクターp3.19（上記文献）を導入し、500 μ g/mlのG418で選択し、さらに限界希釈法によりHM26、HM31、HM21及びHM36の4つの細胞株を得た。細胞表面上のHM1.24抗原の発現数は特願2001-115889に記された方法にてフローサイトメトリで測定したところ、それぞれ細胞あたり 3.8×10^3 、 2.2×10^4 、 2.2×10^4 及び 1.8×10^5 個であった。

実施例 5. ヒト末梢血由来PBMCを用いたADCC活性の測定

（1）ヒトPBMC溶液の調製

健常人よりヘパリン加採血した末梢血を、PBS(-)で2倍に希釈し、Ficoll-PaqueTM PLUS (Amersham Pharmacia Biotech AB)に重層した。これを遠心（500×g、30分間、20℃）した後、単核球画分である中間層を分取した。3回洗浄後、10% FBS/RPMIに懸濁し、ヒトPBMC溶液とした。

（2）標的細胞溶液の調製

実施例4に示したHM1.24抗原(BST-2)を発現するCHO細胞は、細胞剥離緩衝液(Invitrogen Corp)を用いてディッシュから剥離し、10% FBS/RPMI 200 μ Lに浮遊し、5.55MBqのChromium-51を加え、5%炭酸ガスインキュベータ中37℃1時間培養した。この細胞を3回洗浄した後、10%FBS-RPMI1640培地中個々の細胞濃度に調製し、標的細胞溶液とした。

（3）クロム遊離試験（ADCC活性）

標的細胞溶液を96ウェルU底プレートに50 μ Lずつ分注し、各濃度に調製した抗体溶液50 μ Lを添加し、氷上で1時間反応させた後に、ヒトPBMC溶液100 μ Lを加え、5%炭酸ガスインキュベータ中37℃4時間培養し、培養後培養上清100 μ L中の放射活性をガンマカウンターで測定した。下式により特異的クロム遊離率を求めた。

$$\text{特異的クロム遊離率(\%)} = (A - C) \times 100 / (B - C)$$

Aは各ウェルにおける放射活性(cpm)の平均値、Bは標的細胞浮遊液を50 μ L、10%NP-40水溶液 (Nonidet (商標) P-40, ナカライテスク社製) を20 μ L、10%FBS/RPMI培地を130 μ L添加したウェルにおける放射活性(cpm)の平均値、Cは標的細胞浮遊液を50 μ L、10%FBS/RPMI培地を150 μ L添加したウェルにおける放射活性(cpm)の平均値を示す。

実施例 6. β ガラクトシダーゼ安定発現CHO細胞株を用いたADCC活性測定法

エフエクター細胞として健常人の末梢血より比重遠心法で分離した単核球を用いた。すなわち、健常人の末梢血に等量のPBSを加え、Ficoll-PaquePLUS(Pharmacia)に積層し、500gで30分間遠心した。単核球相を分取し、10%FCSを含むRPMI1640で3回洗浄後、10%FCSを含む α -MEMで細胞数が 5×10^6 / mLになるように調製した。

トリプシン-EDTAで剥がし、10%FCSを含む α -MEMで懸濁した 2×10^5 細胞/mLの β ガラクトシダーゼ安定発現CHO#30細胞株50 μ Lと、様々な濃度の抗HM1.24抗体50 μ Lを96ウェルU底プレートに加え、4℃で15分間反応させた。ついでエフエクター細胞100 μ Lを加え、37℃で4時間培養した。培養後、20 μ Lの培養上清を採取し、 β ガラクトシダーゼ活性を測定した。最大遊離酵素量はGalactone-starアッセイキットの細胞溶解緩衝液により遊離される酵素量とした。

細胞傷害活性は、

$$\text{細胞傷害活性 (\%)} = (A - C) \times 100 / (B - C)$$

(% β -ガラクトシダーゼ)

として計算した。ここでAは抗体存在下において遊離された β ガラクトシダーゼ活性(RLU/sec)、Bは細胞溶解緩衝液により遊離された β ガラクトシダーゼ活性(RLU/sec)、Cは抗体を含まず培養液のみで遊離された β ガラクトシダーゼ活性(RLU/sec)を示す。

実施例 7. YB2/0由来ヒト化抗ヒトHM1.24抗体のADCC活性の測定

YB2/0で発現させたHM1.24抗体（HM1.24抗体-YB）のADCC活性を実施例5の方法にて測定した結果を図2～図3に示した。図2に示したように、いずれの標的細胞においても、HM1.24抗体-YBは、DG44（DHFR欠損CHO細胞：Urlaub, G. et al. (1986) Effect of Gamma Rays at the Dihydrofolate Reductase Locus: Deletions) and Inversions. Somatic Cell and Molecular Genetics, 12: 555, 1986）で産生したHM1.24抗体（HM1.24抗体-DG44）よりも高いADCC活性を示した。

具体的には、より低濃度でADCC活性の誘導が認められ、最大のADCC活性にも向上が見られた。特にHM1.24抗原の発現数が少ない標的細胞HM26, HM31を用いた場合、HM1.24抗体-DG44では非常に低いADCC活性しか示さなかったのに対してHM1.24抗体-YBでは高いADCC活性が出現した。また、図3に示したように、標的細胞数に対するPBMC数の割合(E/T比)が25の時のみならず、E/T比が5の場合もHM1.24抗体-YBはHM1.24抗体-DG44よりも高いADCC活性を示した。

実施例 8. 糖鎖の解析

1. 2-アミノピリジン標識糖鎖(PA化糖鎖)の調製

本発明のYB2/0由来抗体、及び対照試料としてCHO由来の抗体に、N-グリコシダーゼ F(Roche)を作用させ、糖鎖を蛋白質から遊離させた(Weitzhandler M. et al., Journal of Pharmaceutical Sciences 83:12(1994), 1670-1675)。セルロースカートリッジ(TAKARA製)を用いた固相抽出(Shimizu Y. et al., Carbohydrate Research 332(2001), 381-388)により脱塩した後濃縮乾固し、2-アミノピリジンによる蛍光標識を行った(Kondo A. et al., Agricultural and Biological Chemistry 54:8(1990), 2169-2170)。得られたPA化糖鎖を、セルロースカートリッジを用いた固相抽出により脱試薬した後

遠心濃縮し、精製PA化糖鎖とした。

2. 精製PA化糖鎖の逆相HPLCによる分析

上記実施例 8 の1項の方法で、本発明のYB2/0由来抗体、及び対照試料としてCH0由来の抗体についてPA化糖鎖の調製を行った後、ODSカラム(TAKARA製 Palpak Type R)による逆相HPLC分析を行い、クロマトグラムを比較した。CH0由来抗体の糖鎖に比較して、YB2/0由来抗体の糖鎖は、20分から35分までに溶出するフコース無しと推定される糖鎖(A-D)のピーク増加が確認された(図4)。

3. 精製PA化糖鎖の二次元マッピングによる分析

上記実施例.8の1項の方法で、本発明のYB2/0由来抗体についてPA化糖鎖の調製を行った後、ODSカラムによる逆相HPLC分析及びアミンカラム(TAKARA製 Palpak Type N)による順相HPLC分析を組み合わせた、二次元マッピングを実施した。具体的には、アミンカラムによる順相HPLCで、精製PA化糖鎖のメインピークを粗分画し、各分画を逆相HPLCにて分析した。

各糖鎖の同定は、PA化糖鎖標準品(TAKARA製、ホーネン製、生化学工業製；図5のK, O, Pを除く)とのHPLCにおける溶出位置の比較及びTOF-MSによる分子量確認にて行った。同定された各糖鎖の相対比を第1表に示す(J, Kの区別及びN, Oの区別は本実施例においては行っていない)。また、表1に示す糖鎖の構造を図5及び図6に示す。この結果本発明のYB2/0由来抗体は、フコースの無い糖鎖が30%以上存在し、且つバイセクティングGlcNAcを持つ糖鎖が存在することが確認された。

表 1

| 糖鎖 | グループ | 各糖鎖相対比 | 各グループ相対比 |
|-------|-------------------------|--------|----------|
| A | -Fuc, -Bisecting GlcNAc | 17.7% | 33.5% |
| B | | 9.9% | |
| C | | 3.9% | |
| D | | 1.9% | |
| E | +Fuc, -Bisecting GlcNAc | 22.9% | 55.2% |
| F | | 21.4% | |
| G | | 5.5% | |
| H | | 5.4% | |
| I | -Fuc, +Bisecting GlcNAc | 2.0% | 3.3% |
| J (K) | | 1.3% | |
| M | +Fuc, +Bisecting GlcNAc | 3.7% | 8.0% |
| N (O) | | 4.2% | |

実施例 9. ヒトGnTIII発現ベクターの作製

ヒトGnTIII遺伝子配列はNCBIデータベース (ACCESSION D13789) より入手した。配列はGENETYX-SV/RCで解析し、繰返し配列が多いことから、PCRによる増幅を容易にする目的で、サイレント変異を複数箇所導入したプライマーをデザインし、PCRによる合成にて取得した。PCRにはKODポリメラーゼ (TOYOBO社) を用い、塩基番号801から870までの二本鎖を最初の鋳型とし、下に示すプライマーを用いて順次、PCRを行った。下記のプライマー配列において、大文字はサイレント変異を導入した塩基を示す。また、数字は翻訳開始部位からの何塩基目かを示す。図7は、GnTIII 遺伝子に対する各プライマーの位置を示す。

リバースプライマー

End(HindIII) :TTTAAGCTTActagacttcgcctcgtccagtttTcc

1596-1488: cttagacttcgcctcgtccagtttTcccgAgcAgcggtTcttccTtcAggacccctgtggcgcccaTccTcccgAgccgtagctcctgggctcctgggtagggtgtgtcc
 1508-1407: ggctcctggtaggggtgtgtccagAagtagtggaaccgggtcgtagttcttcagcaggtacttgggcgcatacatgtgtgcctgggggtcttgcaaggcgggttac
 1427-1324: ctgggggtctgcaggcgggtactcTtgctgctgcgcctcgaaaccagcccccggctgcggatcaggcccggtatgtagttcagggtcccgccttgctcctcgtagtcacc
 1344-1244: ccgcctgtcctcgttagtcacccagcgcgtgggaagtgcgcatcttggggcgacacgagcttgaaagtagatgcccctggggcgtgaagcacccaggagcagtgccc
 1264-1162: tgaagcaccaggagcagtgccagccggcggaagtgAagggggcctgccagcgacccactgcaccaggatgtgTccggtagcgggttctcatactgtctgaagttggg
 1182-1084: ctcatactgtctgaagttgggcacatgggttagtaTtggcggcgggcgagggatggccgtccagcccatcactgcccctggcagcatgtccaccgtgcagccc
 1103-1004: agcatgtccaccgtgcagccctgacacaccctccaggggtgcccggTtgctccaAaagaaTccgttagagcgacgtgcgcgatgtggaaggcggaaagggtctcggg
 1023-922: gtggaaaggcgaagggtctgggtccagccatcgtagagcttgaggaaGaggacgcgtcacggggccggggtctcgtccggcatcgtcaatgtagaagacgtcgtc
 941-851: tcaatgatgaagacgtcgtcggggccgcagggttgcgcagccgcgagacgcgtcctggggtagggaaaggtagcagggtatgtcgtcggcgatcc
 870-801: caggtagtcgtcggcgatccaTccAtcTtgTccTccAgggAggAaagtggtccaggaaagacatagagc

380-300 ggccggTctctccagcatcttggtagccggggttgaagcagacggccTccAgccctgggtgcgcacgaaataactcgggtgggtgtcc

320-241 acgaaatactcggtaggtgtctcggggcagcaccaagttccaccggtagggctcctcggccgcttgctggggcggcagcggg

Bam-359 TTGgaTccgttggccccctcaggcttctcctcggTcgtcccgAgggcggTctctccagcatcttgg

フォワードプライマー

Initial (BamHI) :TTTCTCGAGatgagacgtacaagctctttctcatgttc

1-97: atgagacgtacaagctctttctcatgtttctgtatgagccggcctgtgcctcatctctctgcacttcttcaagacccctgtcctatgtcaccttcc
 78-177: cctgtcctatgtcaccttcccAcgagaaactggccctccctcagccctaaacctgggtgtccagctttttctggaacaatatgccccgggtcacgccccagggccagc
 158-259: cggctacgccccagggccagcccTgagccaggaggccctgacctgtcgtgtacccccactctacttccccactcgccctgctgcagcccgctggccccagccaagg
 239-331: agcccgctgccccagcaaggcggccggaggagctccaccgggtggacttgggtgctgccccggagagacaaccggaggtatttctgtgcggcaccagg
 312-409: gtatttcgtgcgccaccaaggcTggAgggcgtctgtcttcaaaccggccaccaagatgctggagagAgAccggccTccggagacgAccggagggagaaagccctggagg
 390-472: AccggaggagaaaggcctgagggggcccaacggAtcctcgggcCgggcgAccacccgggtacctctctgagcggccccggggaggcgccagg
 453-556: gagcggccggggagcgcacggggggggccggaggTgcAcgAcgcaagtgggtggagtgctgtgtTctggccccggAtgggacggagccccagctggccccactgtgg
 535-618: agctgcggggcgtgccccactgtgggtgcagtaTtccaaacctggccTaccagggaggcggcctgggtggccccaggggagggtggccggccgctc
 598-696: agggagggtgcccggccggcggcgtcatTaaTgcTatcaacgtcaaccagaggttcgacctgctggagcgtggcgttccacggagcctggggcggagcgtggtagcggcc
 677-777: tggggcgacgtgggtggacggcccttgggtgggtggtgcgaggtccaaacttcacggccttatggggggggccggcggcctcaagttccggggagatgctggaccaatgggcacc
 758-820: agatgctgaccacaatggcaccttcgaggtacatccggccacaagggtgctctctatgtcttccctgggacc
 801-870: gctctatgtctctcctggaccacttTccTccTggAggAcgAcaAgaTggAtggatcgccggagcgactacctg

必要に応じて増幅断片をアガロースゲル電気泳動して、目的断片をゲルから切り出して精製したものを次のPCRの鋳型とした。最終的にPCRのみで全長を増幅することが困難であったため、予めプライマー内にサイレント変異として挿入しておいたBamHI部位を用いて、その前後の断片を増幅後に連結することにより、全長ヒトGnTIII遺伝子を取得した。図11～図15に、生来型ヒトGnTIIIをコードする塩基配列（配列番号：28）（GnTIII ori.nuc）と変異型ヒトGnTIIIをコードする塩基配列（配列番号：29）（GnTIII mut.nuc）と対比を示す。図中、星印は、両配列の対応する塩基が同一であることを示す。

ヒトGnTIIIは、pcDNA3.1(Hygro-)（Invitrogen社）のXhoI/HindIII部位に組込み、配列を確認した。

実施例10. HM1.24抗体-DG44発現CHO細胞でのGnTIIIの発現

上記実施例.9で得られた10 μ gのGnTIII/pcDNA3.1(Hygro-)をHM1.24抗体-DG44発現CHO株にエレクトロポレーション法で1.5kV, 25 μ Fの条件で導入した。培養は5% CO₂インキュベーター内で37°Cで行った。96ウェルプレート（Falcon社）に、10% FCSを含むIMDM培地（Gibco社）を用いて、10細胞/100 μ L/wellで蒔きこみ、2日間培養した。400 μ g/mLハイグロマイシンを含む10% FCS-IMDM培地に代え、1～2週間、細胞の選択を行った。ハイグロマイシン耐性コロニーが出現し、増殖の認められた細胞の培養上清を回収し、ヒト化抗ヒトHM1.24抗体抗体量を実施例.2のELISA法により測定した。

実施例11. GnTIII発現ヒト化抗ヒトHM1.24抗体産生CHO細胞のADCC活性によるスクリーニング

GnTIIIを強制的に発現させたヒト化抗ヒトHM1.24抗体産生細胞（クローンNo.1～31）に由来する化抗ヒトHM1.24抗体及びHM1.24抗体-DG44の培養液を抗体濃度400ng/mlに培地を用いて希釈し、実施

例 6 に示した方法を用いてADCC活性を測定し比較した（図 8）。

最終的にADCC活性とヒト化抗ヒトHM1.24抗体発現量および増殖速度を考慮してスクリーニングを行い、クローンNo.6（57B2）を得た。

実施例12. GnTIIII発現CHO細胞由来ヒト化抗ヒトHM1.24抗体のADCC活性の測定

GnTIIIIを強制的に発現させたヒト化抗ヒトHM1.24抗体産生細胞に由来するヒト化抗ヒトHM1.24抗体のADCC活性を実施例(B)の方法にて測定した結果を図 9 に示した。クローンNo.3, No.6（57B2）とHM1.24抗体-DG44を比較した結果、いずれのクローンもHM1.24抗体-DG44よりも高いADCC活性を示した。

産業上の利用可能性

本発明によれば、高いADCC活性を有する抗HM1.24抗体を製造することができる。

請 求 の 範 囲

1. 糖鎖が改変された、HM1.24抗原に対する抗体（抗HM1.24抗体）。

2. 糖鎖の改変により抗体依存性細胞傷害性（Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity；ADCC）が増強された、請求項1に記載のHM1.24抗原に対する抗体（抗HM1.24抗体）。

3. 前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項1又は2に記載の抗体。

4. 前記抗体がキメラ抗体である、請求項1又は2に記載の抗体。

5. 前記抗体がヒト化抗体である、請求項1又は2に記載の抗体。

6. α -1,6コアーフコース（ α -1,6core fucose）を含まない糖鎖を有する、請求項1～5のいずれか1項に記載の抗体。

7. バイセクティング（bisecting）N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）構造を有する糖鎖を有する、請求項1～5のいずれか1項に記載の抗体。

8. α -1,6コアーフコース（ α -1,6core fucose）を含まない糖鎖を有し、且つバイセクティング（bisecting）N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）構造を有する糖鎖を有する、請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体。

9. フコースを含まない糖鎖を有する抗HM1.24抗体を含む抗体組成物であって、フコースを含まない糖鎖の相対比率が30%以上である抗体組成物。

10. 請求項6に記載の抗体の製造方法において、HM1.24抗原に対する抗体（抗HM1.24抗体）をコードする核酸が導入された糖鎖へ

のフコース付加能力を欠失した細胞を培養し、そして当該培養物から当該抗体を採取することを特徴とする方法。

1 1. 請求項 7 に記載の抗体の製造方法において、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ III (GnTIII) をコードする核酸を導入した宿主細胞を培養し、当該培養物から当該抗体を採取することを特徴とする方法。

1 2. 請求項 8 に記載の抗体の製造方法において、N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ III (GnTIII) をコードする核酸を導入した糖鎖へのフコース付加能を欠失した細胞を培養し、そして当該培養物から当該抗体を採取することを特徴とする方法。

Fig.1

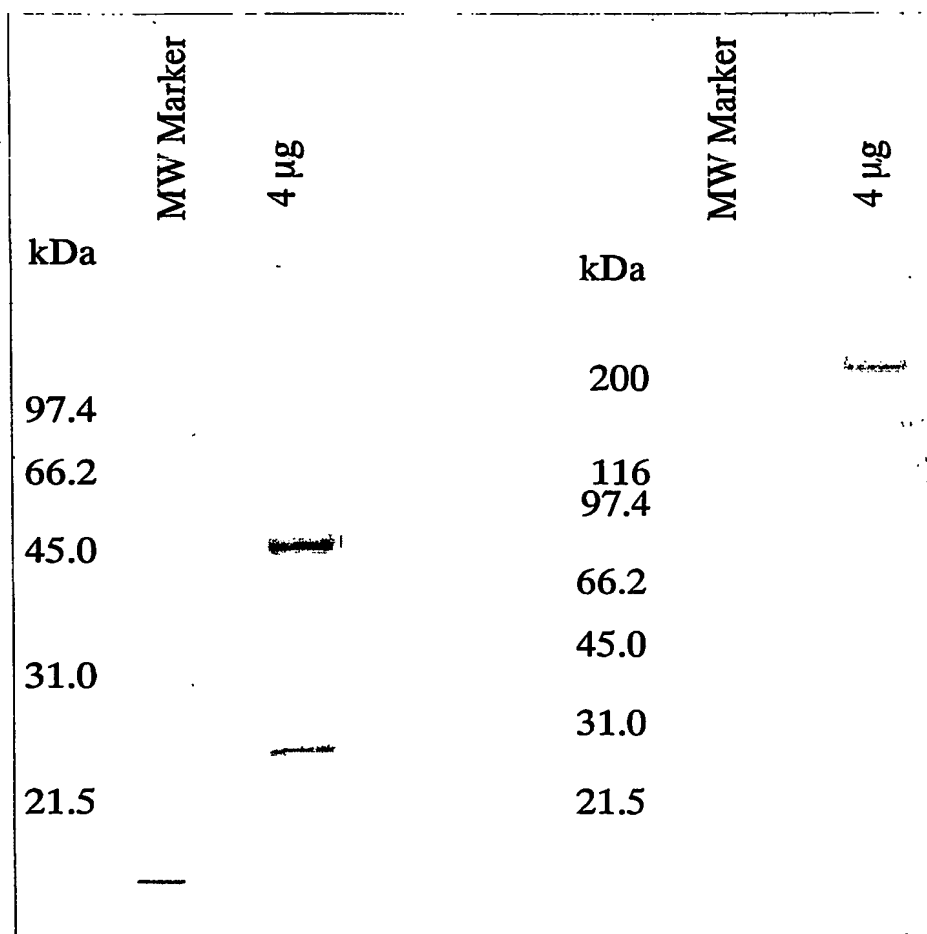


Fig.2

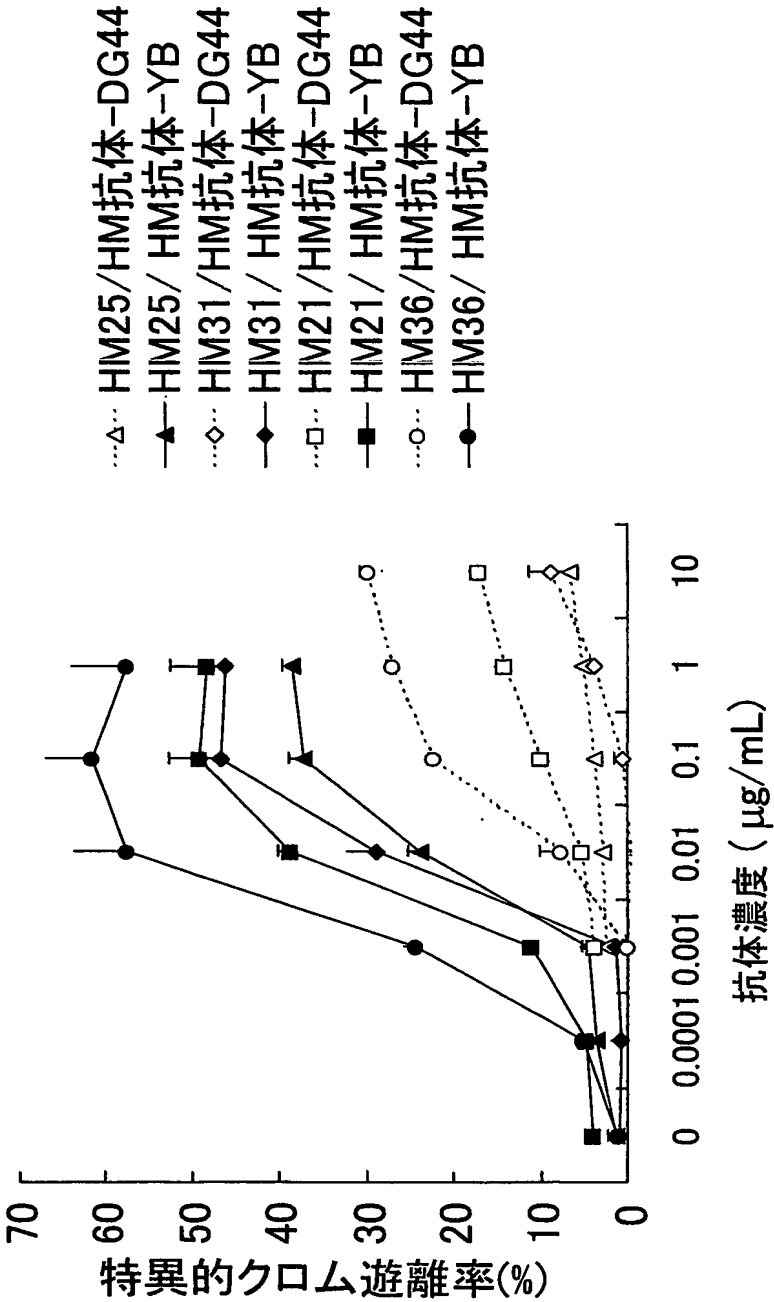


Fig.3

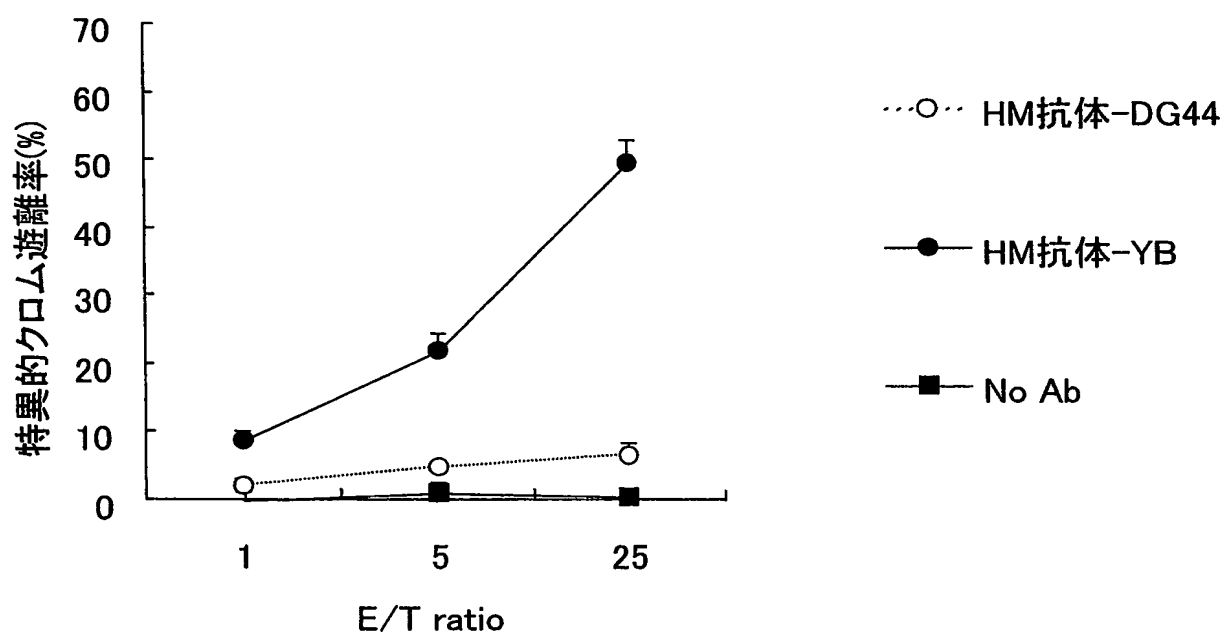


Fig.4

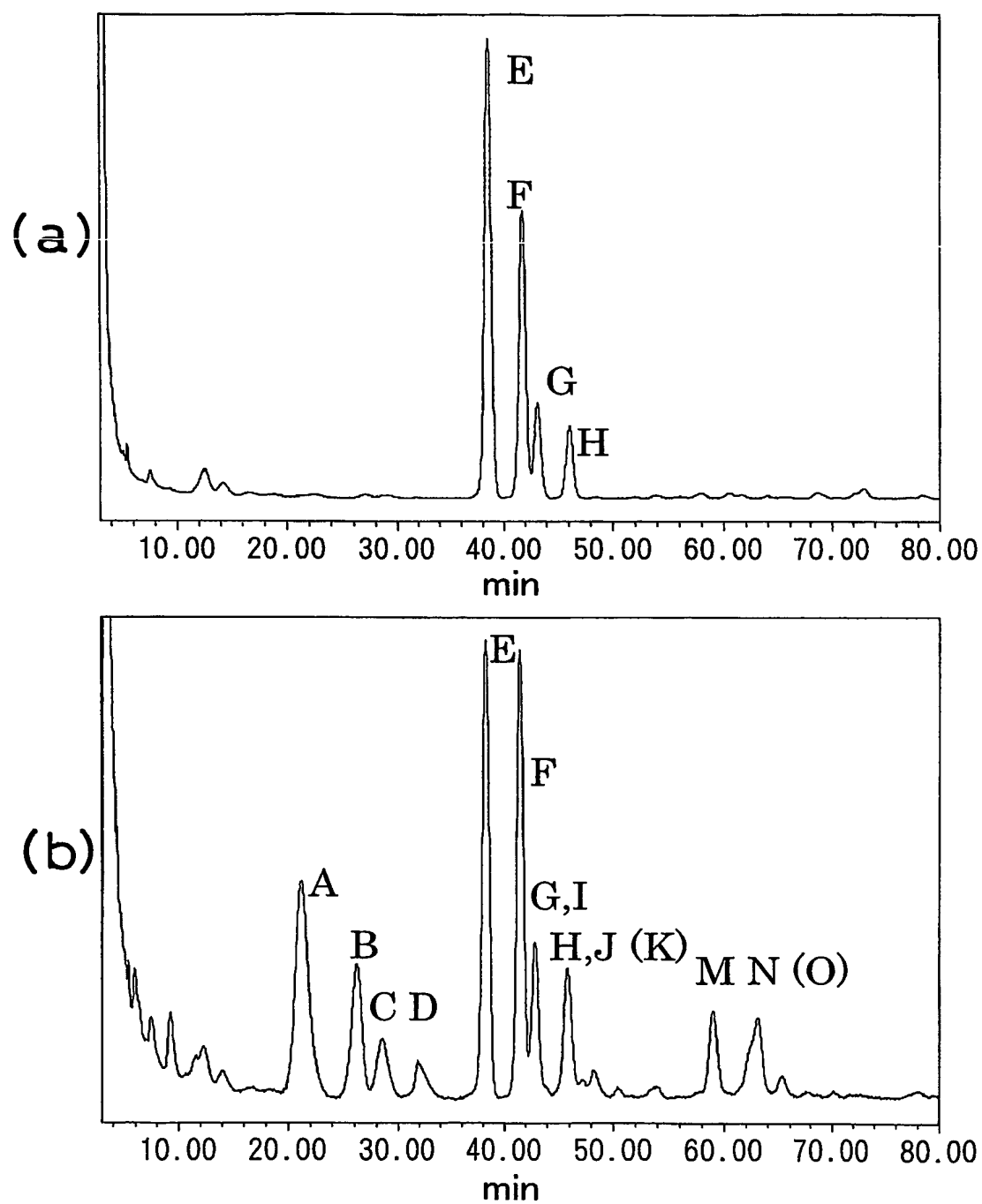


Fig.5

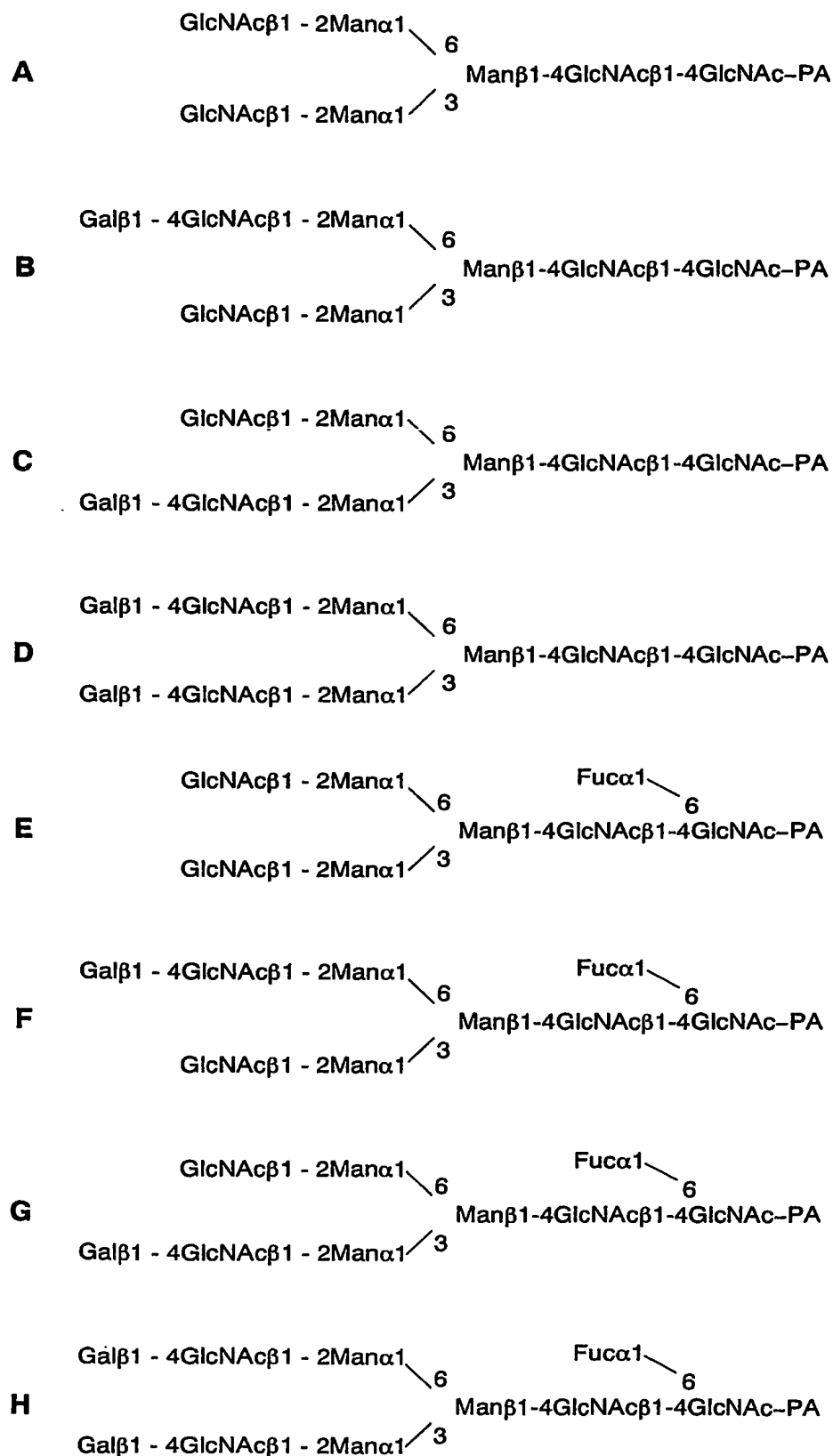


Fig.6

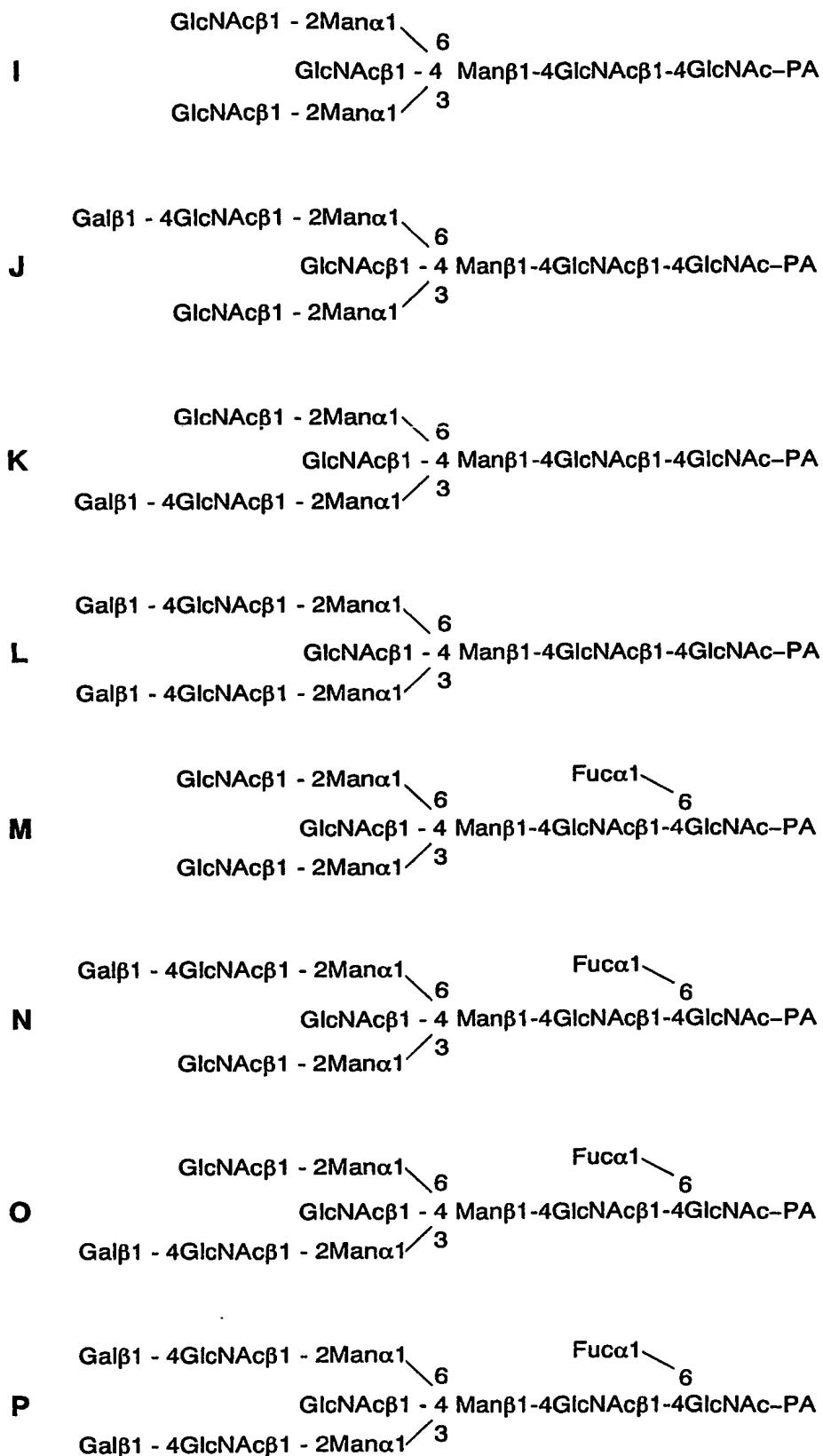


Fig.7

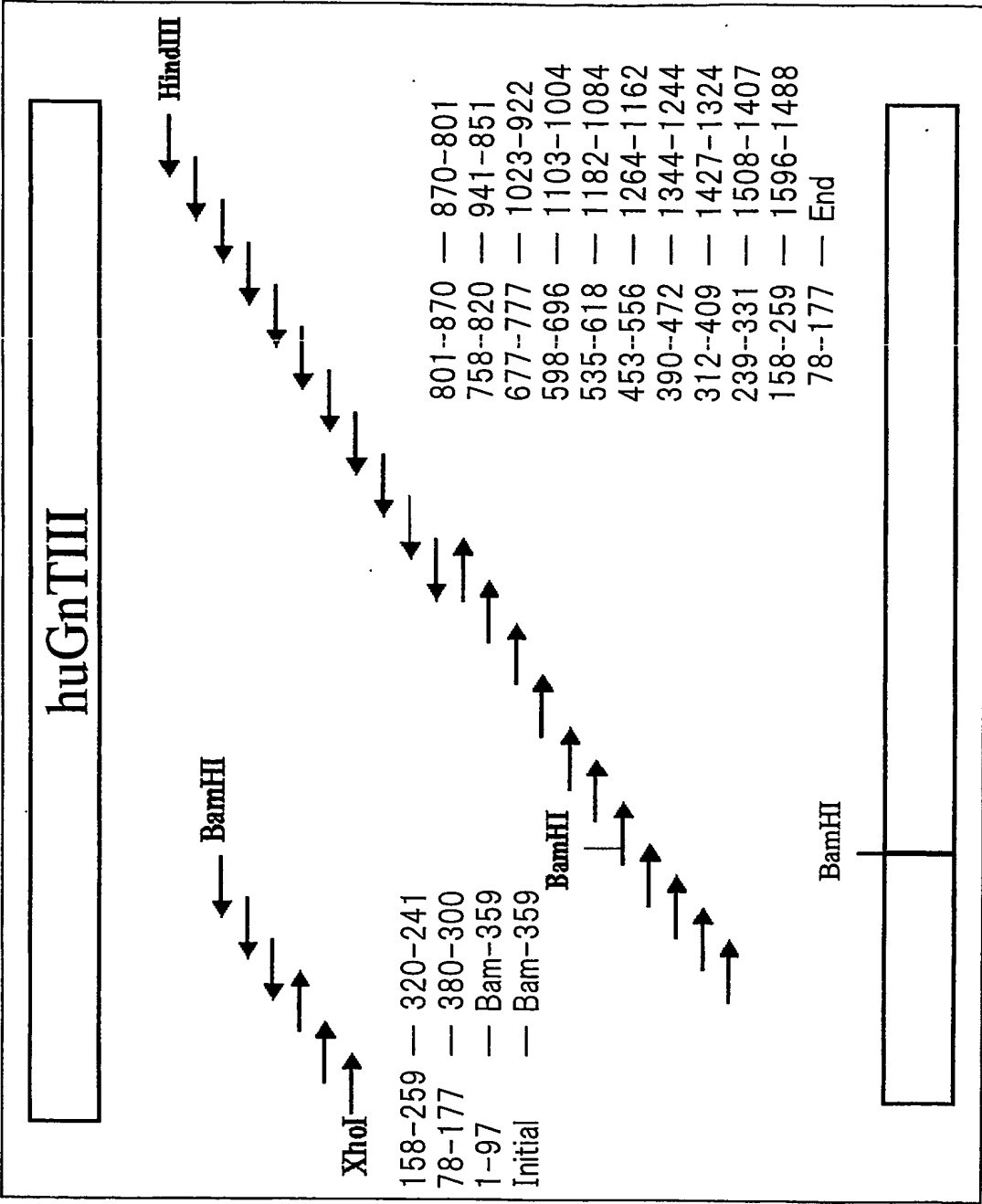


Fig.8

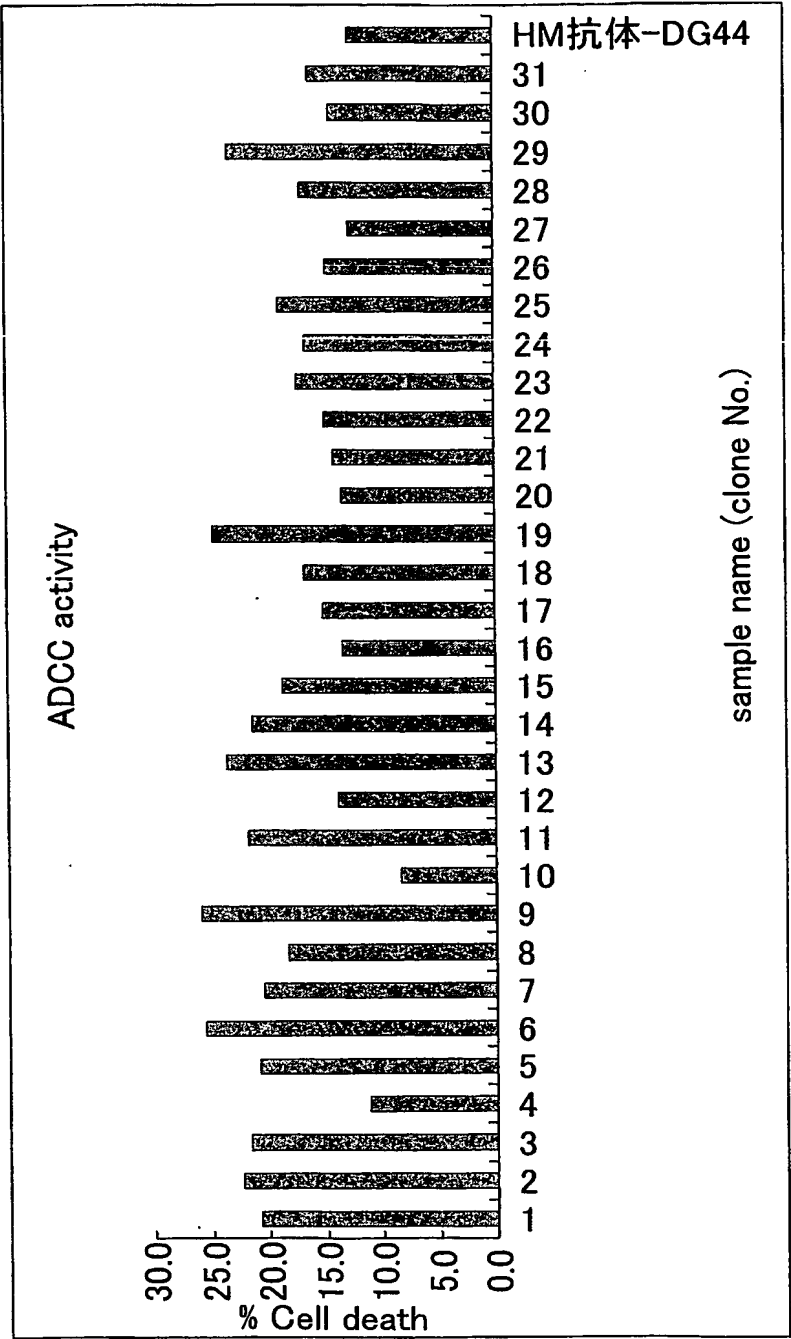


Fig.9

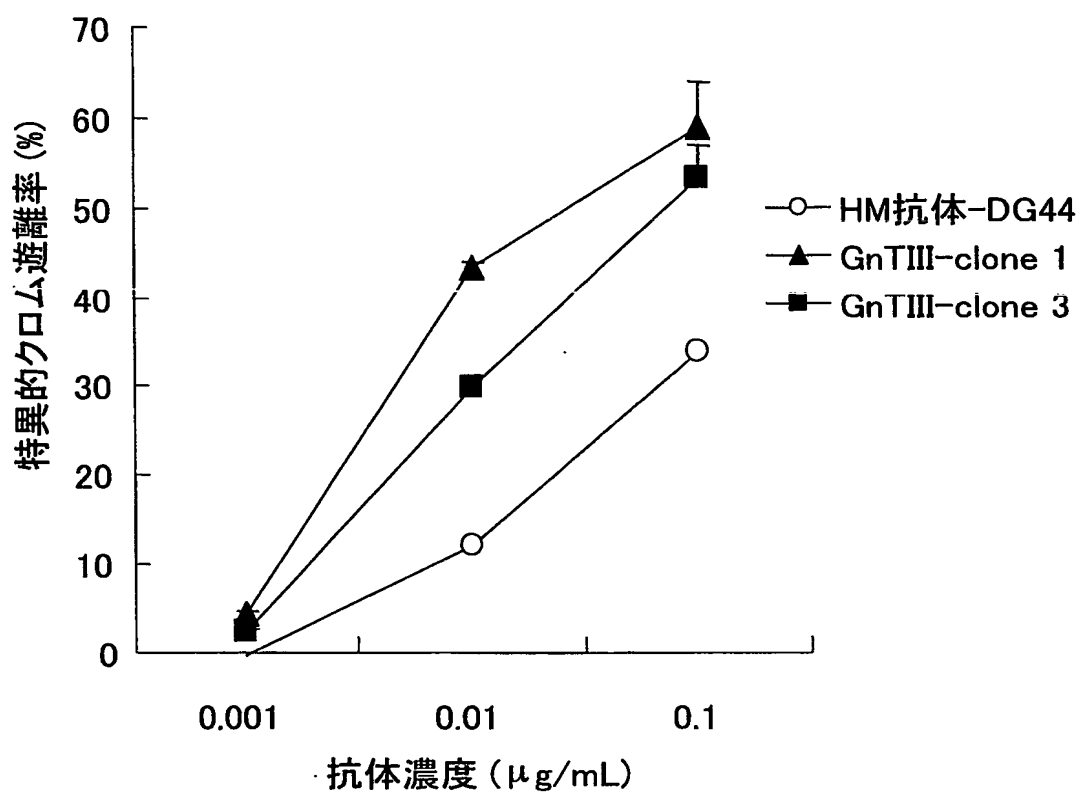


Fig.10

GnTIII mut.nuc 1:ATGAGACGCTACAAGCTCTTCTCATGTTCTGTATGGCCGGCCTGTGCCTCATCTCCTTC 60
GnTIII ori.nuc 1:ATGAGACGCTACAAGCTCTTCTCATGTTCTGTATGGCCGGCCTGTGCCTCATCTCCTTC 60

GnTIII mt.nuc 61:CTGCACTTCTTCAAGACCCCTGTCCATATGTACCTTCCCACGAGAACTGGCCTCCCTCAGC 120
GnTIII ori.nuc 61:CTGCACTTCTTCAAGACCCCTGTCCATATGTACCTTCCCCCGAGAACTGGCCTCCCTCAGC 120

GnTIII mt.nuc 121:CCTAACCTGGTGTCAGCTTTTCTGGAACAATGCCCCCGGTACGCCCCAGGCCAGCCCT 180
GnTIII ori.nuc 121:CCTAACCTGGTGTCAGCTTTTCTGGAACAATGCCCCCGGTACGCCCCAGGCCAGCCCC 180

GnTIII mt.nuc 181:GAGCCAGGAGGCCCTGACCTGCTGCGTACCCACTCTACTCCACTCGCCCCCTGCTGCAG 240
GnTIII ori.nuc 181:GAGCCAGGAGGCCCTGACCTGCTGCGTACCCACTCTACTCCACTCGCCCCCTGCTGCAG 240

GnTIII mt.nuc 241:CCGCTGCCGCCAGCAAGGCGCGGAGGAGCTCCACCGGGTGGACTTGGTGTGCCCGAG 300
GnTIII ori.nuc 241:CCGCTGCCGCCAGCAAGGCGCGGAGGAGCTCCACCGGGTGGACTTGGTGTGCCCGAG 300

Fig.11

GnTIII mt.nuc 301:GACACCACGAGTATTTCGTGCGCACCAAGGCTGGAGGCGTCTGCTTCAAAACCCGGCACC 360
GnTIII ori.nuc 301:GACACCACGAGTATTTCGTGCGCACCAAGGCTGGAGGCGTCTGCTTCAAAACCCGGCACC 360

GnTIII mt.nuc 361:AAGATGCTGGAGAGACCGCCTCCGGACGACCGGAGGAGAAGCCTGAGGGGGCCAAACGGA 420
GnTIII ori.nuc 361:AAGATGCTGGAGAGCGCCCCCGGACGGCCGGAGGAGAAGCCTGAGGGGGCCAAACGGC 420

GnTIII mt.nuc 421:TCCTCGGCCCGGACCAACCCGGTACCTCCTGAGCGCCCGGAGCGCACGGGGGGCCGA 480
GnTIII ori.nuc 421:TCCTCGGCCCGGCGCCACCCCGGTACCTCCTGAGCGCCCGGAGCGCACGGGGGGCCGA 480

GnTIII mt.nuc 481:GGTGACGACGCAAGTGGGTGGAGTGCGTGTGTCTGCCCGGATGGCACGGACCCAGCTGC 540
GnTIII ori.nuc 481:GGCGCCCGGCGCAAGTGGGTGGAGTGCGTGTGTCTGCCCGGCTGGCACGGACCCAGCTGC 540
** ** **
GnTIII mt.nuc 541:GGCGTGCCCACTGTGGTGCAGTATTCCAACCTGCCTACCAAGGAGCGGCTGGTGCCCCAGG 600
GnTIII ori.nuc 541:GGCGTGCCCACTGTGTGCAGTACTCCAACCTGCCCAACCAAGGAGCGGCTGGTGCCCCAGG 600

Fig.12

```

GnTIII mt.nuc      601:GAGGTGCCGCGCGGTCAATTAATGCTATCAACGTCAACACGAGTTCGACCTGCTGGAC 660
GnTIII ori.nuc     601:GAGGTGCCGCGCGGTCAATCAACGCCATCAACGTCAACACGAGTTCGACCTGCTGGAC 660
*****
***** ** ** *****
*****

GnTIII mt.nuc      661:GTGCGCTTCCACGAGCTGGGCGACGTGGTGACGCCCTTGTGGTGTGCGAGTCCAACTTC 720
GnTIII ori.nuc     661:GTGCGCTTCCACGAGCTGGGCGACGTGGTGACGCCCTTGTGGTGTGCGAGTCCAACTTC 720
*****
*****

GnTIII mt.nuc      721:ACGGCTATGGGAGCCGCGCGCTCAAGTCCGGGAGATGCTGACCAATGGCACCTTC 780
GnTIII ori.nuc     721:ACGGCTATGGGAGCCGCGCGCTCAAGTCCGGGAGATGCTGACCAATGGCACCTTC 780
*****
*****

GnTIII mt.nuc      781:GAGTACATCCGCCACAAGGTGCTCTATGCTCTCCTGGACCACCTTCCTCCTGGAGGACGA 840
GnTIII ori.nuc     781:GAGTACATCCGCCACAAGGTGCTCTATGCTCTCCTGGACCACCTTCCTCCTGGAGGACGA 840
*****
***** ** ** ** **

GnTIII mt.nuc      841:CAAGATGGATGGATCGCCGACGACTACCTGGGCACCTTCCTCACCCAGGACGGCGTCTCG 900
GnTIII ori.nuc     841:CAGGACGGCTGGATCGCCGACGACTACCTGGGCACCTTCCTCACCCAGGACGGCGTCTCG 900
*****
***** ** ** **

```

Fig.13

```

GnTIII mt.nuc  901:CGGCTGCGCAACCTGGGCCCGACGACGTCTTCATCATTGACGATCGGACGAGATCCCG 960
GnTIII ori.nuc 901:CGGCTGCGCAACCTGGGCCCGACGACGTCTTCATCATTGACGATCGGACGAGATCCCG 960
*****
GnTIII mt.nuc  961:GCCCCGTGACGGCGTCCTGTTCCTCAAGCTCTACGATGGCTGGACCGAGCCCCCTTCGCCCTTC 1020
GnTIII ori.nuc 961:GCCCCGTGACGGCGTCCTTTCCCTCAAGCTCTACGATGGCTGGACCGAGCCCCCTTCGCCCTTC 1020
*****
GnTIII mt.nuc 1021:CACATGCGCACGTCGCTCTACGGATCTTTTGGAAAGCAACGGGGCACCCCTGGAGGTGGTG 1080
GnTIII ori.nuc 1021:CACATGCGCACGTCGCTCTACGGCTTCTTCTGGAAGCAGCCGSGECACCCCTGGAGGTGGTG 1080
*****
GnTIII mt.nuc 1081:TCAGGCTGCACGGTGGACATGCTGCAGGCAGTGATGGGCTGGACGGCATCCGCCCTGCCG 1140
GnTIII ori.nuc 1081:TCAGGCTGCACGGTGGACATGCTGCAGGCAGTGATGGGCTGGACGGCATCCGCCCTGCCG 1140
*****
GnTIII mt.nuc 1141:CGCCGCCCAATACTACACCATGCCCCAACTTCAGACAGTATGAGAACCGCACCCGGACACATC 1200
GnTIII ori.nuc 1141:CGCCGCCCAGTACTACACCATGCCCCAACTTCAGACAGTATGAGAACCGCACCCGGCCACATC 1200
*****

```

Fig.14

GnTIII mt.nuc 1201:CTGGTGCA GTGGTCGCTGGGCAGCCCCCTTCACTTCGCCGGCTGGCACTGCTCCTGGTGC 1260
GnTIII ori.nuc 1201:CTGGTGCA GTGGTCGCTGGGCAGCCCCCTGCACCTTCGCCGGCTGGCACTGCTCCTGGTGC 1260

GnTIII mt.nuc 1261:TTCACGCCCGAGGGCATCTACTCAAGCTCGTGTCCGCCAGAA TGGCGACTTCCCACGC 1320
GnTIII ori.nuc 1261:TTCACGCCCGAGGGCATCTACTCAAGCTCGTGTCCGCCAGAA TGGCGACTTCCCACGC 1320

GnTIII mt.nuc 1321:TGGGGTGACTACGAGGACAAGCGGACCTGAAC TACATCCGGGCTGATCCGCACCGGG 1380
GnTIII ori.nuc 1321:TGGGGTGACTACGAGGACAAGCGGACCTGAAC TACATCCGGGCTGATCCGCACCGGG 1380

GnTIII mt.nuc 1381:GGCTGGTTCGACGGCACGCAGCAAGAGTACCCGCCCTGCAGACCCCGAGCAGCATGTAT 1440
GnTIII ori.nuc 1381:GGCTGGTTCGACGGCACGCAGCAGGAGTACCCGCCCTGCAGACCCCGAGCAGCATGTAT 1440

GnTIII mt.nuc 1441:GCGCCCAAGTACCTGCTGAAGAACTACGACCGGTTCCACTACCTTCTGGACAACCCCTAC 1500
GnTIII ori.nuc 1441:GCGCCCAAGTACCTGCTGAAGAACTACGACCGGTTCCACTACCTTCTGGACAACCCCTAC 1500

Fig.15

```
GnTIII mt.nuc 1501:CAGGAGCCCGAGGAGCACGGCTGCGGAGGATGGCGCCACAGGGGTCTGAAGGAAGACCG 1560
GnTIII ori.nuc 1501:CAGGAGCCCGAGGAGCACGGCGGCGGGTGGCGCCACAGGGGTCCCGAGGGAAGGCCG 1560
*****
***** ** ***** ** ***** ***
GnTIII mt.nuc 1561:CCTGCTCGGGGAAACTGGACGAGCGGAAGTCTAG 1596
GnTIII ori.nuc 1561:CCCGCCCGGGGCAAACTGGACGAGCGGAAGTCTAG 1596
** ** ***** *****
```

SEQUENCE LISTING

<110>Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha

<120>Anti HM1.24 Antibody With Modified Sugar Chains

<130>P817

<150>JP 2003-207165

<151>2003-08-11

<160>29

<210>1

<211>39

<221>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Forward primer Initial(BamHI)

<400>1

tttctcgaga tgagacgcta caagctcttt ctcatgttc

39

<210>2

<211>97

<221>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Forward primer 1-97

<400>2

atgagacgct acaagctctt tctcatgttc tgtatggccg gcctgtgcct catctccttc

60

ctgcacttct tcaagaccct gtcctatgtc accttcc

97

<210>3

<211>100

<221>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Forward primer 78-177

<400>3

cctgtcctat gtcaccttcc cacgagaact ggctccctc agccctaacc tgggtgtccag 60
ctttttctgg aacaatgccc cggtcacgcc ccaggccagc 100

<210>4

<211>102

<221>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Forward primer 158-259

<400>4

cggtcacgcc ccaggccagc cctgagccag gaggccctga cctgctgcgt accccactct 60
actcccactc gccctgtctg cagccgctgc cgcccagcaa gg 102

<210>5

<211>93

<221>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Forward primer 239-331

<400>5

agccgctgcc gccagcaag gcggccgagg agctccaccg ggtggacttg gtgctgcccg 60
aggacaccac cgagtatttc gtgcgcacca agg 93

<210>6

<211>98

<221>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Forward primer 312-409

<400>6

gtatttcgtg cgcaccaagg ctggaggcgt ctgcttcaaa cccggcacca agatgctgga 60
gagaccgcct ccgggacgac cggaggagaa gcctgagg 98

<210>7
<211>83
<221>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Forward primer 390-472
<400>7
accggaggag aagcctgagg gggccaacgg atcctcggcc cggcgaccac cccggtacct 60
cctgagcgcc cgggagcgca cgg 83
<210>8
<211>104
<221>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Forward primer 453-556
<400>8
gagcgcccg gaggcgacgg ggggcccagg tgcacgacgc aagtgggtgg agtgcgtgtg 60
tctgcccga tggcacggac ccagctgcgg cgtgcccact gtgg 104
<210>9
<211>84
<221>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Forward primer 535-618
<400>9
agctgcggcg tgcccactgt ggtgcagtat tccaacctgc ctaccaagga gcggctggtg 60
cccagggagg tgccgcgccg cgtc 84
<210>10
<211>99
<221>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Forward primer 598-696

<400>10

agggaggtgc cgcgccgcgt cattaatgct atcaacgtca accacgagtt cgacctgctg 60

gacgtgcgct tccacgagct gggcgacgtg gtggacgcc 99

<210>11

<211>101

<221>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Forward primer 677-777

<400>11

tgggcgacgt ggtggacgcc tttgtggtgt gcgagtccaa cttcacggct tatggggagc 60

cgcggccgct caagttccgg gagatgctga ccaatggcac c 101

<210>12

<211>63

<221>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Forward primer 758-820

<400>12

agatgctgac caatggcacc ttcgagtaca tccgccacaa ggtgctctat gtcttcctgg 60

acc 63

<210>13

<211>70

<221>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Forward primer 801-870

<400>13

gctctatgtc ttcctggacc actttcctcc tggaggacga caagatggat ggatcgccga 60

cgactacctg 70

<210>14

<211>37

<221>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Reverse primer End(HindIII)

<400>14

tttaagctta ctagacttcc gcctcgtcca gttttcc 37

<210>15

<211>109

<221>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Reverse primer 1596-1488

<400>15

ctagacttcc gcctcgtcca gttttcccg agcaggcggc cttccttcag gaccctgtg 60

gcgccatcct cccgcagccg tgctcctggg ctctctgtag gggttggtcc 109

<210>16

<211>102

<221>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Reverse primer 1508-1407

<400>16

ggctcctggt aggggttggt cagaaggtag tggaaccggc cgtagttctt cagcaggtac 60

ttgggcgcac acatgtgctc gctgggggtct gcaggcgggt ac 102
<210>17
<211>104
<221>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Reverse primer 1427-1324
<400>17
ctgggggtctg caggcgggta ctcttgctgc gtgccgtcga accagccccc ggtgcggatc 60
aggccgcgga tgtagttcag gtcccgttg tcctcgtagt cacc 104
<210>18
<211>101
<221>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Reverse primer 1344-1244
<400>18
ccgcttgctc tcgtagtcac cccagcgtgg gaagtcgcca ttctgggcgg acacgagctt 60
gaagtagatg ccctcgggcg tgaagcacca ggagcagtc c 101
<210>19
<211>102
<221>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Reverse primer 1264-1162
<400>19
tgaagcacca ggagcagtc cagccggcga agtgaagggg gctgcccagc gaccactgca 60
ccaggatgtg tccggtgcgg ttctcatact gtctgaagtt gg 102
<210>20
<211>99

<221>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Reverse primer 1182-1084

<400>20

ctcatactgt ctgaagttgg gcatggtgta gtattggcgg cggcgcaggc ggatgccgtc 60

cagcccatat actgcctgca gcatgtccac cgtgcagcc 99

<210>21

<211>100

<221>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Reverse primer 1103-1004

<400>21

agcatgtcca ccgtgcagcc tgacaccacc tccagggtgc ccggttgctt ccaaaagaat 60

ccgtagagcg acgtgcgcat gtggaaggcg aagggtctcg 100

<210>22

<211>102

<221>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Reverse primer 1023-922

<400>22

gtggaaggcg aagggtctcg tccagccatc gtagagcttg aggaacagga cgccgtcacg 60

ggccgggata tcgtccgcat cgtcaatgat gaagacgtcg tc 102

<210>23

<211>91

<221>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Reverse primer 941-851

<400>23

tcaatgatga agacgtcgtc gggccgcagg ttgcgcagcc gcgagacgcc gtcctgggtg 60
aggaaggtgc gcaggtagtc gtcggcgatc c 91

<210>24

<211>70

<221>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Reverse primer 870-801

<400>24

caggtagtcg tcggcgatcc atccatcttg tcgtcctcca ggaggaaagt ggtccaggaa 60
gacatagagc 70

<210>25

<211>81

<221>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Reverse primer 380-300

<400>25

ggcgggtctct ccagcatctt ggtgccgggt ttgaagcaga cgcctccagc cttggtgcgc 60
acgaaatact cgggtggtgtc c 81

<210>26

<211>80

<221>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Reverse primer 320-241

<400>26

acgaaatact cgggtggtgtc ctcgggcagc accaagtcca cccggtggag ctccctcggcc 60
gccttgctgg gcggcagcgg 80

<210>27

<211>68

<221>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Reverse primer Bam-359

<400>27

tttgatccg ttggccccct caggcttctc ctccggtcgt cccggaggcg gtctctccag 60
catcttgg 68

<210>28

<211>1596

<221>DNA

<213>Homo sapiens

<220>

<223>Nucleotide sequence encoding human GnTIII

<400>28

atgagacgct acaagctctt tctcatgttc tgtatggccg gcctgtgcct catctccttc 60
ctgcatttct tcaagacctt gtcctatgtc accttcccc gagaactggc ctccctcagc 120
cctaacctgg tgtccagctt tttctggaac aatgccccgg tcacgcccc ggccagcccc 180
gagccaggag gccctgacct gctgcgtacc ccaactctact cccactcgcc cctgctgcag 240
ccgctgccgc ccagcaaggc ggccgaggag ctccaccggg tggacttggg gctgcccag 300
gacaccaccg agtatcttct gcgcaccaag gccggcggcg tctgcttcaa acccggcacc 360
aagatgctgg agaggccgcc cccgggacgg ccggaggaga agcctgaggg ggccaacggc 420
tcctcggccc ggccggccacc ccggtacctc ctgagcgccc gggagcgcac gggggggccga 480
ggcgcccggc gcaagtgggt ggagtgcgtg tgcctgccc gctggcacgg acccagctgc 540
ggcgtgcccc ctgtgggtga gtactccaac ctgcccacca aggagcgggt ggtgcccagg 600
gaggtgccgc gccgcgtcat caacgccatc aacgtcaacc acgagttcga cctgctggac 660
gtgcgcttcc acgagctggg cgacgtgggt gacgcctttg tgggtgtgca gtccaacttc 720
acggcttatg gggagccgcg gccgctcaag ttccgggaga tgctgaccaa tggcaccttc 780
gagtacatcc gccacaaggt gctctatgtc ttccctggacc acttcccggc cggcggccgg 840
caggacggct ggatcgccga cgactacctg cgcaccttcc tcaccagga cggcgtctcg 900

cggctgcgca acctgcggcc cgacgacgtc ttcattcattg acgatgcgga cgagatcccg 960
 gcccgtagcg gcgtcctttt cctcaagctc tacgatggct ggaccgagcc cttcgccttc 1020
 cacatgcgca cgtcgctcta cggtcttctt tggaagcagc cgggcaccct ggaggtggtg 1080
 tcaggctgca cgggtggacat gctgcaggca gtgtatgggc tggacggcat ccgcctgcgc 1140
 cgccgccagt actacacat gcccaacttc agacagtatg agaaccgcac cggccacatc 1200
 ctggtgcagt ggtcgctggg cagccccctg cacttcgccg gctggcactg ctccctggtgc 1260
 ttcacgcccg agggcatcta ctcaagctc gtgtccgcc agaatggcga ctccccacgc 1320
 tggggtgact acgaggacaa gcgggacctg aactacatcc gcggcctgat ccgcaccggg 1380
 ggctggttcg acggcacgca gcaggagtac ccgcctgcag accccagcga gcacatgtat 1440
 gcgcccgaagt acctgctgaa gaactacgac cggttccact acctgctgga caaccctac 1500
 caggagccca ggagcacggc ggccggcggg tggcgccaca ggggtcccga gggaaggccg 1560
 cccgcccggg gcaaactgga cgaggcggaa gtctag 1596

<210>29

<211>1596

<221>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Artificial nucleotide sequence encoding human GnTIII

<400>29

atgagacgct acaagctctt tctcatgttc tgtatggccg gcctgtgcct catctccttc 60
 ctgcacttct tcaagacctt gtcctatgtc accttccac gagaactggc ctccctcagc 120
 cctaacctgg tgtccagctt tttctggaac aatgccccgg tcacgcccga ggccagccct 180
 gagccaggag gccctgacct gctgcgtacc cactctact cccactcgcc cctgctgcag 240
 ccgctgccgc ccagcaaggc ggccgaggag ctccaccggg tggacttggt gctgcccag 300
 gacaccaccg agtatctcgt gcgcaccaag gctggaggcg tctgcttcaa acccggcacc 360
 aagatgctgg agagaccgcc tccgggacga ccggaggaga agcctgaggg ggccaacgga 420
 tcctcggccc ggcgaccacc ccggtacctc ctgagcgccc gggagcgcac ggggggcccga 480
 ggtgcacgac gcaagtgggt ggagtgcgtg tgtctgccc gatggcacgg acccagctgc 540
 ggctgcccc ctgtggtgca gtattccaac ctgcctacca aggagcggct ggtgcccagg 600
 gaggtgccgc gccgcgtcat taatgctatc aacgtcaacc acgagttcga cctgctggac 660
 gtgcgcttcc acgagctggg cgacgtggtg gacgcctttg tgggtgtgca gtccaacttc 720
 acggcttatg gggagccgcg gccgctcaag ttccgggaga tgctgaccaa tggcaccttc 780
 gagtacatcc gccacaaggt gctctatgtc ttcttgacc actttcctcc tggaggacga 840
 caagatggat ggatcgccga cgactacctg cgcaccttc tcaccagga cggcgtctcg 900

| | | | | | | |
|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------|
| cggctgcgca | acctgcggcc | cgacgacgtc | ttcatcattg | acgatgcgga | cgagatcccg | 960 |
| gcccgtgacg | gcgtcctggt | cctcaagctc | tacgatggct | ggaccgagcc | cttcgccttc | 1020 |
| cacatgcgca | cgtcgctcta | cggattcttt | tggaagcaac | cgggcaccct | ggaggtggtg | 1080 |
| tcaggctgca | cgggtggacat | gctgcaggca | gtgtatgggc | tggacggcat | ccgcctgcgc | 1140 |
| cgccgccaat | actacaccat | gcccacttc | agacagtatg | agaaccgcac | cggacacatc | 1200 |
| ctgggtgcagt | ggtcgctggg | cagccccctt | cacttcgccg | gctggcactg | ctcctgggtg | 1260 |
| ttcacgccc | aggcatcta | cttcaagctc | gtgtccgcc | agaatggcga | cttcccacgc | 1320 |
| tggggtgact | acgaggacaa | gcgggacctg | aactacatcc | gcggcctgat | ccgcaccggg | 1380 |
| ggctggttcg | acggcacgca | gcaagagtac | ccgcctgcag | accccagcga | gcacatgtat | 1440 |
| gcgccaagt | acctgctgaa | gaactacgac | cggttccact | accttctgga | caaccctac | 1500 |
| caggagccca | ggagcacggc | tcgaggagga | tggcgccaca | ggggtcctga | aggaagaccg | 1560 |
| cctgctcggg | gaaaactgga | cgaggcgga | gtctag | | | 1596 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011812

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K16/30, C12N15/12, C12P21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K16/30, C12N15/12, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y | WO 98/37913 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 03 September, 1998 (03.09.98), Full text & JP 10-298106 A & EP 972524 A1 & US 2002/034507 A1 | 1-12 |
| Y | JP 10-286088 A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 27 October, 1998 (27.10.98), Full text & WO 98/35698 A1 & EP 997152 A1 | 1-12 |
| Y | WO 02/31140 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 18 April, 2002 (18.04.02), Full text & EP 1331266 A1 | 1-12 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 October, 2004 (20.10.04)

Date of mailing of the international search report
09 November, 2004 (09.11.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011812

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| Y | JP 2002-512014 A (UNAMA, Pablo), 23 April, 2002 (23.04.02), Full text & WO 99/54342 A1 | 1-12 |
| Y | WO 02/79255 A1 (IDEC PHARMACEUTICALS Co.), 10 October, 2002 (10.10.02), Full text (Family: none) | 1-12 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/011812

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

| | | |
|--|---|------------------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) | | |
| Int. Cl. 7 C07K16/30, C12N15/12, C12P21/08 | | |
| B. 調査を行った分野 | | |
| 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) | | |
| Int. Cl. 7 C07K16/30, C12N15/12, C12P21/08 | | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの | | |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) | | |
| BIOSIS/WPI (DIALOG) | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | WO 98/37913 A1 (中外製薬株式会社) 1998.09.03, 全文 & JP 10-298106 A & EP 972524 A1 & US 2002/034507 A1 | 1-12 |
| Y | JP 10-286088 A (中外製薬株式会社) 1998.10.27, 全文 & WO 98/35698 A1 & EP 997152 A1 | 1-12 |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 | | |
| * 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献 | | |
| 国際調査を完了した日 | 国際調査報告の発送日 | |
| 20.10.2004 | 09.11.2004 | |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員) 鈴木 恵理子 | 4N 3126 |
| 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 | | |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | WO 02/31140 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2002.04.18, 全文 & EP 1331266 A1 | 1 - 1 2 |
| Y | JP 2002-512014 A (ウマナ パプロ) 2002.04.23, 全文 & WO 99/54342 A1 | 1 - 1 2 |
| Y | WO 02/79255 A1 (IDEC PHARMACEUTICALS Co.) 2002.10.10, 全文 (ファミリーなし) | 1 - 1 2 |

第 I 欄 スクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ

☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット

☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期

☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：